

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18380122

研究課題名 (和文) 海藻のプロスタグランジン産生機構

研究課題名 (英文) Mechanism of prostaglandin production in seaweed

研究代表者

板橋 豊 (ITABASHI YUTAKA)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：60142709

研究成果の概要：

紅藻オゴノリ *Gracilaria vermiculophylla* はプロスタグランジン (PG) を産生する特異な海藻であるが、その生成機構は哺乳動物とは異なる。すなわち、組織 (細胞膜) が細切や凍結・解凍などの傷害を受けると細胞内のガラクトリパーゼが活性化して膜脂質 (グリセロ糖脂質) が加水分解し、アラキドン酸を遊離する。これにリポキシゲナーゼが作用して 8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸が生成し、その後 15-ヒドロペルオキシ PGE₂ を経て PGE₂ が生合成される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2007 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：*Gracilaria vermiculophylla*, プロスタグランジン, グリセロ糖脂質, ガラクトリパーゼ, アラキドン酸, シクロオキシゲナーゼ, リポキシゲナーゼ, 質量分析

1. 研究開始当初の背景

オゴノリ *Gracilaria vermiculophylla* は熱帯から温帯の海域に広く分布する紅藻類に属する海藻で、寒天原料として古くから利用されているが、近年はプロスタグランジン (PG) 産生海藻として知られるよ

うになった。植物が PG を産生することは稀であるが、オゴノリは組織が傷害を受けることによって PG を多量に産生する特異な海藻である。哺乳動物の産生する PG の代謝経路はアラキドン酸カスケードとして既に確立しているが、オゴノリ PG の生成機構は哺乳

乳動物とは異なり、アラキドン酸から PG が生成する経路や関連酵素の存在など、その詳細は不明であり、藻体における PG の役割も明らかにされていない。

2. 研究の目的

哺乳動物の産生するプロスタグランジン (PG) の代謝経路はアラキドン酸カスケードとして既に確立しているが、オゴノリ PG の生成機構は哺乳動物とは全く異なると推測されているものの、基質の分子構造や生合成経路、関連酵素の存在など、その詳細は不明である。本研究は、オゴノリにおける PG 合成過程の全容を明らかにすることを目的とする。すなわち、基質と推測される膜脂質の構造、膜脂質からのアラキドン酸の遊離に関わる酵素の性質 (精製と基質特異性)、及びアラキドン酸から PG 合成に至るまでの代謝産物とそれに関わる酵素の特異性を検討する。また、オゴノリ属 (*Gracilaria*) の海藻の PG 産生能を広くスクリーニングし、種間のエイコサノイド産生能の差異を明らかにする。

3. 研究の方法

海藻におけるプロスタグランジン (PG) 生成経路の全容を明らかにするために、以下の研究を実施する。

- (1) オゴノリ *Gracilaria vermiculophylla* における PG 生成の基質及び前駆体と考えられるグリセロ糖脂質の分子種分析法 (高速液体クロマトグラフィー/質量分析: HPLC/MS) の確立。
- (2) アラキドン酸を含む遊離脂肪酸と PG 類 (PGA₂, PGE₁, PGE₂, 15-hydroperoxy-PGE₂, PGF₂α 等) の同時分析法 (HPLC/MS) の開発。
- (3) オゴノリより PG 生合成の第一段階に関与すると考えられる酵素 (ガラクトリパーゼ) の精製と基質特異性の解明。
- (4) シクロオキシゲナーゼ (COX) 及びリポキシゲナーゼ (LOX) 阻害剤によるエイコサノイド産生能の測定。
- (5) HPLC/MS 及び MALDI/TOF-MS によるオゴノリにおけるアラキドン酸カスケード (代謝産物) の分析。
- (6) オゴノリ属 (*Gracilaria*) 海藻におけるエイコサノイド合成の比較生化学。

4. 研究成果

- (1) オゴノリを種々の条件下で処理して (凍結解凍, 冷蔵保存, 室温保存, 加

熱), 細胞膜を構成する脂質成分の変動を観察した。その結果, 凍結解凍した場合, 細胞膜を構成するグリセロ糖脂質より PG の前駆体脂肪酸であるアラキドン酸が大量に遊離することを見出した。

- (2) アラキドン酸の遊離に関与する酵素として, 脂質加水分解酵素 (ガラクトリパーゼ) を分離精製し, その性質を明らかにした (分子量約 40kDa, 至適温度 37°C, 至適 pH8.0)。本酵素は, モノガラクトシルジアシルグリセロールやホスファチジルコリンに対して高い活性を示すことを明らかにした。
- (3) (1) と (2) の結果から, オゴノリは細胞膜が損傷を受けると活性化したガラクトリパーゼによって細胞膜脂質が加水分解してアラキドン酸が遊離し, これに種々の酵素が作用して PG を生成するものと推測した。
- (4) オゴノリ及び近縁海藻における PG 合成過程の全容を明らかにするためには, アラキドン酸代謝産物を迅速かつ精密に分析する方法が不可欠であることから, 本研究では質量分析法を検討した。その結果, マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI/TOF-MS) がこの目的に極めて有効であることを認め, 海藻由来 PG の簡易同定法を開発した。
- (5) 日本産オゴノリ *G. vermiculophylla* は PG の他に種々のリポキシゲナーゼ (LOX) 代謝産物 (ジヒドロキシエイコサテトラエン酸: diHETE など) を産生することを見出した。
- (6) 数種のニュージーランド産オゴノリ (*G. chilensis* など) を分析した結果, PG を産生する種と diHETE を産生する種などアラキドン酸の代謝産物は種によって大きく異なることを見出した。
- (7) *G. vermiculophylla* の産生する特異な 15-hydroperoxy-PGE₂ の構造を明らかにし, これを他の代謝産物から分離・定量する逆相 HPLC/質量分析法 (ESI-MS) を確立した。
- (8) オゴノリ PG 類を 9-アンスリルメチルエステル誘導体に変換して高感度 (fmol レベル) で検出する蛍光 HPLC 法を確立した。
- (9) 日本産オゴノリ *G. vermiculophylla* とニュージーランド産オゴノリ (*G. chilensis* など) から, 新規エイコサノイド (8-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 = 8-HpETE 及び 5, 8-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸 = 5, 8-diHETE) を見出した。 (Fig. 1)

(10)

形体のよく似た *G. vermiculophylla* と *G. chilensis* のエイコサノイド組成は大きく異なることが明らかになり、アラキドン酸カスケードを用いて *Gracilaria* 属海藻を化学的に分類するが可能性が示された。

(11) 種々のシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤とリポキシゲナーゼ (LOX) 阻害剤のエイコサノイド産生に及ぼす影響を詳細に調べた結果、COX 阻害剤は PG 産生に影響を及ぼさないことが確認された。一方、LOX 阻害剤は HETE の生成を抑制するものの逆に PG の生成を促進することを明らかにした。

(12) 以上の結果から、*G. vermiculophylla* の PG の生成機構は哺乳動物とは異なり、細胞膜脂質から遊離したアラキドン産に LOX が作用して 8-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (8-HpETE) が生成し、その後 15-ヒドロペルオキシ PGE₂ (15-HpPGE₂) を経て PGE₂ が生合成されると考えられる (Fig. 2)

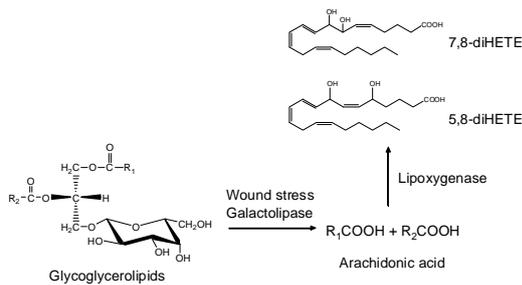


Fig. 1 *G. chilensis* におけるエイコノイド産生

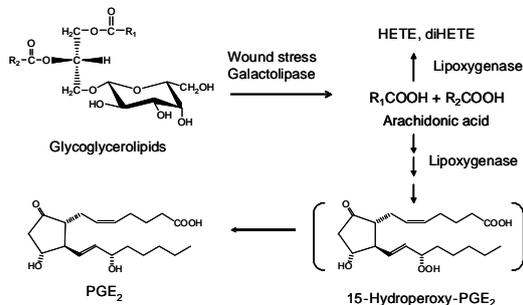


Fig. 2 *G. vermiculophylla* におけるエイコサノイド産生

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. 本田真己, 鹿島晃洋, 高橋是太郎, 板橋豊: 褐藻エゾノネジモクのジガラクトシルジアシルグリセロール分子種. 日本水産学会誌, 印刷中. 査読有.
2. M. I. Illijas, I. J. Rimer, H. Yasui and Y. Itabashi: Lipid and fatty acid compositions of the little-known and rarely collected alga *Exophyllum wentii* Weber-van Bosse from Bali Island, Indonesia. *J. Oleo Sci.* 58(3), 103-110 (2009). 査読有.
3. S. Arato, H. Ito, K. Miyashita, K. Hayakawa and Y. Itabashi. A facile method for the detection of aldehydes in oxidized lipids using solid-phase microextraction fiber and gas chromatograph equipped with a septum-free injector. *J. Oleo Sci.* 58(1), 17-22 (2009). 査読有.
4. M. I. Illijas, M. Terasaki, R. Nakamura, N. Iijima, A. Hara, N. Fusetani and Y. Itabashi: Purification and characterization of glycerolipid acyl-hydrolase from the red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *Fish. Sci.* 74, 670-676 (2008). 査読有.
5. 相澤知里, 塩崎梨絵子, 板橋豊: 逆相高速液体クロマトグラフィーにおける 1,2-ジアシルグリセロール位置異性体の分離挙動. 分析化学, 56(10), 833-839 (2007). 査読有.
6. 山科智裕, 李 鍾壽, 板橋豊: ホシゴマシズ筋肉脂質由来 1-*O*-アルキルグリセロールのキラル高速液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析. 北大水産彙報, 57(3), 43-48 (2007). 査読無.
7. 山科智裕, 李 鍾壽, 板橋豊: キラル高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による 1-*O*-アルキルグリセロール光学異性体の分離とアルキル基の同定. 分析化学, 55(9), 643-650 (2006). 査読有.
8. S. Momchilova, Y. Itabashi, B. Nikolova-Damyanova and A. Kuksis: Regioselective separation of isomeric triacylglycerols by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Stationary phase and

mobile phase effects. *J. Sep. Sci.* 29, 2578-2583 (2006). 査読有.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Y. Itabashi: Analysis of prostaglandins in seaweeds caught from several nations. The International Health Food Symposium. September 19-20, 2008. Kangnung National University, Korea.
2. Y. Itabashi, C. Aizawa and A. Kuksis: Improved resolution of reverse isomers of 1,2-diacylglycerols as 3,5-dinitrophenylurethanes by reversed-phase HPLC on polymeric octadecyl silica. 99rd American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo. May 18-21, 2008. Seattle
3. Y. Itabashi, N. Fusetani, V. Svetashev and M. Vyssotski: Mass Spectrometric Analysis of Ecosanoids in Seaweeds. 2nd East Asian Marine Bioscience Symposium. December 3, 2007. Sapporo.
4. Y. Itabashi, N. Suzuki, N. Fusetani and A. Kuksis: Detection and identification of prostaglandins (PG) in seaweeds. 98th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo. May 13-16, 2007. Quebec City.
5. Y. Itabashi: HPLC resolution of stereo- and regioisomeric glycerolipids (Herbert J. Dutton Award Lecture). 98th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo. May 13-16, 2007. Quebec City.

〔図書〕(計 3 件)

1. 板橋 豊(分担執筆): 改定第2版 油脂・脂質の基礎と応用. Pp. 208. 2009.
2. 板橋 豊(分担執筆): 水圏生化学の基礎. 恒星社厚生閣. pp. 241. 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板橋 豊 (ITABASHI YUTAKA)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号: 60142709

(2) 研究分担者

伏谷 伸宏 (FUSETANI NOBUHIRO)
北海道大学・大学院水産科学研究院・
客員教授
研究者番号: 70012010

安井 肇 (YASUI HAJIME)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号: 00200494

西村 一彦 (NISHIMURA KAZUHIKO)

北海道立衛生研究所・研究員
研究者番号: 90414284

北出 幸広 (KITADE YUKIHIRO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・特任准
教授
研究者番号: 9039999

(3) 連携研究者

該当なし